

Editeurs

Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel

Auteurs:

- Dr. Anja Messerschmitt
- Dr. Gesche Standke
- Dr. Christiane Röckl Michel

Illustrations:

- Fonds de l'industrie chimique, Francfort / Main
- Pharma Information, Bâle
- Dr. Marcus Baumann

Contact:

Novartis Pharma AG
Dr. Christiane Röckl Michel
Biotech Labor
WKL-122.2.26A
Postfach
CH-4002 Basel

Tel. 061/696 13 72

E-Mail: christiane.roeckl_michel@novartis.com

Novartis Pharma AG
Dr. Gesche Standke
Biotech Labor
WKL-122.2.26A
Postfach
CH-4002 Basel

Tel. 061/696 13 72

E-Mail: gesche.standke@novartis.com

Internet : www.novartis.ch/schullabor

Reproduction autorisée avec l'accord de l'éditeur et à condition d'indiquer les sources.
Copies destinées à l'usage scolaire souhaitées.

(Edition 2012; Stage au Biotech Labor)

Table des matières

Les bases	5
Génie génétique.....	5
Modèles d'organismes	5
Bactéries, E.coli K12.....	6
Plasmides.....	6
Transformation	7
La résistance aux antibiotiques.....	7
Enzymes, enzymes de restriction.....	7
Introduction aux travaux pratiques	8
Matériel de laboratoire	8
Glossaire spécialisé.....	9
Mode d'emploi des micropipettes:.....	10
Mode d'emploi de la centrifugeuse	13
Expérience 1: Purification de l'ADN	14
Expérience 2: Caractérisation de l'ADN par analyse de restriction.....	16
Expérience 3: Séparation et mise en évidence de fragments d'ADN par électrophorèse sur gel.....	18

Expérimenter le génie génétique

Les chercheurs qui travaillent sur l'ADN ne sont généralement pas en mesure d'observer directement la plupart de leurs expériences. En effet, la taille des macromolécules cellulaires comme l'ADN ou les protéines est de l'ordre du nanomètre. Bien que le fil d'ADN dans une cellule humaine atteindrait une longueur de près de 2 mètres, la molécule n'est pas visible au microscope en raison de son petit diamètre de 1,1 nanomètres.

Afin de rendre visible l'ADN, il faut des millions voire des milliards de copies de la molécule. Pour ce faire, des séquences plus courtes d'ADN sont intégrées dans des molécules d'ADN circulaires appelées plasmides, qui se multiplient au sein des cellules des bactéries, indépendamment du cycle de la cellule. Lorsqu'on multiplie les bactéries, on obtient en peu de temps le nombre de copies d'ADN souhaitées (amplification).

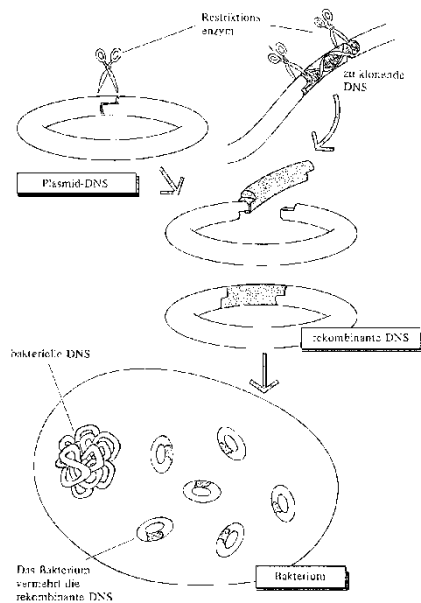
Des ADN différents (appartenant à des espèces différentes ou à des individus différents au sein d'une même espèce par ex.) se différencient par leur séquence de nucléotides. Là aussi, les différences dans la séquence de bases ne pouvant s'observer directement sur la molécule, on peut en rendre compte indirectement par l'emploi d'enzymes de restriction (analyse de restriction).

Le but du cours consiste à différencier divers ADN par analyse de restriction. Vous travaillerez avec des cellules de bactéries qui contiennent soit les plasmides pGEM1, pUC18 ou pBluescript. La première expérience consiste à isoler l'ADN de plasmide par analyse de restriction. Au cours de la seconde expérience vous « découperez » cet ADN de plasmide à l'aide d'un enzyme de restriction afin de séparer au moyen de l'électrophorèse sur gel, au cours de la troisième expérience, les morceaux d'ADN ainsi obtenus. A la fin du cours, vous devriez être en mesure de déterminer quel est l'ADN de plasmide que votre groupe aura analysé.

Vous allez réaliser pendant le cours des expériences avec des quantités très petites. Cela demande un travail très précis et très concentré.

Les bases

Génie génétique

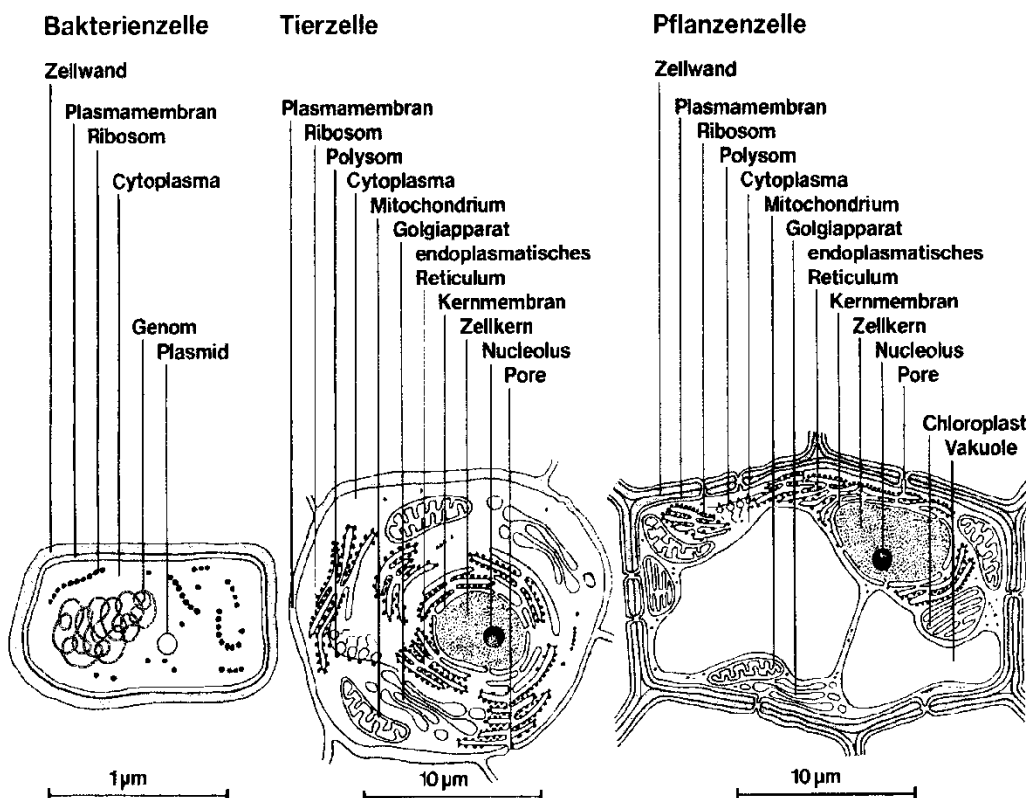


Le génie génétique permet d'isoler des gènes du matériel héréditaire et d'analyser les informations contenues dans les gènes. Grâce au génie génétique, des gènes supplémentaires peuvent être introduits dans le matériel génétique d'un être vivant, ou il est possible de modifier ou d'éliminer des gènes de ce même matériel génétique. Cela permet d'obtenir des micro-organismes, des plantes et des animaux possédant des propriétés déterminées. La nouveauté du génie génétique réside dans les échanges de gènes même entre différentes espèces. Ainsi, par exemple, le gène d'une bactérie peut être activé dans une plante.

Le génie génétique est un domaine particulier de la biotechnologie moderne. Les premières expériences en génie génétique ont été effectuées en Amérique en 1973.

Modèles d'organismes

En principe, chaque cellule peut servir de source d'ADN et chaque organisme peut être modifié génétiquement. Mais dans la recherche, on n'utilise que certaines espèces du monde des micro-organismes, des plantes et des animaux. Les modèles particulièrement prisés sont les bactéries *Escherichia coli* (abréviation E.coli) pour les micro-organismes, l'*Arabidopsis Thaliana* pour les plantes le poisson-zèbre pour le monde animal.



La cellule : le plus petit élément constitutif du vivant. (transparents du Fonds de l'industrie chimique, Frankfurt/Main.; Biotechnologie/Gentechnik, 1996)

Bactéries, E.coli K12

Dans le cours nous utilisons la souche de bactérie E.coli K12. Les bactéries sont constituées d'une seule cellule et peuvent contenir de l'ADN de plasmide en plus de leur ADN génomique (voir illustration: La cellule). E coli est une bactérie typique de la flore intestinale humaine. La souche de laboratoire utilisée depuis environ 50 ans, E. coli K-12, en raison de différents défauts génétiques, ne provoque aucune maladie chez l'homme et ne colonise pas la flore intestinale de manière durable. Dans les bonnes conditions de laboratoire ces bactéries se cultivent et se multiplient facilement. Ainsi elles remplissent deux critères importants pour un modèle d'organismes. E. coli K-12 fait partie des organismes les mieux étudiés et les mieux caractérisés dans le domaine de la biologie moléculaire, et actuellement, il est souvent utilisé comme organisme-hôte fiable, dans la fabrication de protéines recombinantes.

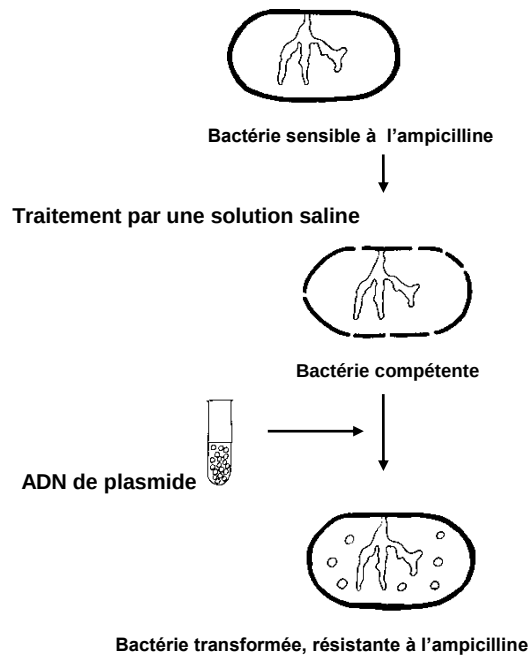
Plasmides

Les plasmides sont des petites molécules d'ADN en forme d'anneau. On ne les trouve que dans les bactéries où ils servent de réservoir supplémentaire d'information génétique. Toutes les bactéries ne possèdent pas de plasmide. L'ADN de plasmide se multiplie indépendamment du chromosome de la bactérie et est, pendant la division de la cellule, distribué entre les cellules filles. L'information génétique sur les plasmides peut donc très facilement être modifiée, remplacée ou rajoutée. On peut alors observer les conséquences de ces modifications sur une bactérie qui ne possédait avant pas d'ADN de plasmide. Cette méthode s'appelle la transformation des bactéries.

Les plasmides pGEM1, pUC18 et pBluescript qu'on utilise dans le cours, sont des molécules d'ADN synthétique, fabriquées pour être employées dans la recherche. On appelle ces plasmides de laboratoire des vecteurs, car ils servent de molécules de transport pour les fragments d'ADN modifiés qui doivent être introduits dans des cellules. Les vecteurs pGEM1, pUC18 et pBluescript ont des fonctions très importantes telles que : 1. La capacité de se multiplier dans la cellule de la bactérie indépendamment du cycle de la cellule (origin of replication). 2. La capacité de se multiplier abondamment pour atteindre environ une centaine de copies par cellule. 3. Contenir un gène de résistance aux antibiotiques permettant de sélectionner les bactéries transformées de celles qui ne le sont pas.

Transformation

Comme, en principe, l'introduction d'ADN de plasmide pur dans des bactéries se révèle très inefficace, les cellules bactériennes doivent être soumises à un traitement spécifique préalable. Ainsi, elles sont soumises à diverses solutions salines qui rendent leurs parois cellulaires poreuses et, jusqu'à un certain degré, perméables à l'ADN de plasmide. Les bactéries ainsi traitées sont appelées „bactéries compétentes“. Lorsqu'on incube les bactéries compétentes avec de l'ADN de plasmide dans certaines conditions, une partie d'entre elles va incorporer l'ADN de plasmide. Afin de reconnaître ces bactéries, on les sélectionne en fonction d'une caractéristique qu'elles ont acquise par l'incorporation d'ADN.



Quand un plasmide génétiquement modifié est introduit dans une bactérie, la bactérie devient un organisme génétiquement modifié (OGM). La production et le maniement des OGM sont strictement réglementés par la loi.

La résistance aux antibiotiques

Les plasmides pGEM1, pUC18 et pBluescript portent comme marqueur sélectif le gène de l'enzyme β -lactamase, responsable de la résistance à l'ampicilline. Chez l'humain, la résistance à l'ampicilline peut être contrée par l'ajout d'acide clavulanique qui agit comme inhibiteur de l'enzyme β -lactamase. Le gène d'ampicilline peut donc être classé comme un risque mineur.

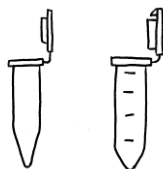
Enzymes, enzymes de restriction

Les enzymes sont des protéines capables de catalyser des réactions chimiques (transformation métabolique). Les enzymes de restriction sont des endonucléases, qui n'hydrolysent, donc «découpent» les liaisons désoxyribose-phosphore ester de la double chaîne de l'ADN lorsqu'elles reconnaissent une séquence spécifique de l'ADN. C'est pour cette raison que les enzymes de restriction sont également appelés plus simplement gènes-ciseaux. Dans ce cours, l'enzyme de restriction utilisé est le Nci1

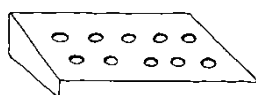
Introduction aux travaux pratiques

Matériel de laboratoire

1.5mL 2mL



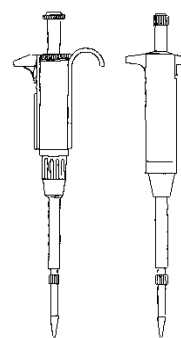
Eprouvettes Eppendorf



Rack (portoir)



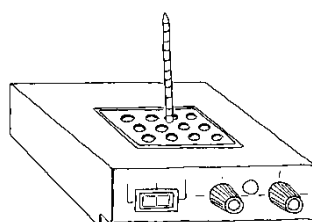
Pointes de pipettes



Micropipettes



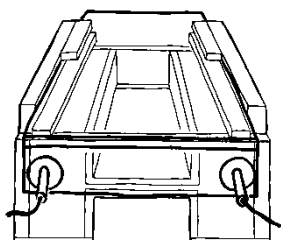
Centrifugeuse



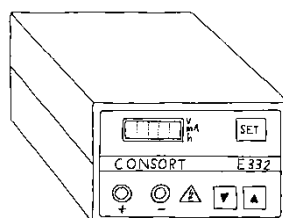
Thermo-bloc



Mélangeur Vortex



Cuve à électrophorèse



Générateur



UV Transilluminator

Glossaire spécialisé

Incuber	Conserver dans certaines conditions
Liquide de culture	milieu nutritif liquide dans lequel on réalise des cultures cellulaires.
Pipeter	Adjonction d'un volume de liquide défini à l'aide d'une pipette
Sédiment	Eléments d'un liquide récoltés par centrifugation (cf. surnageant)
Sélectionner	Rechercher, en fonction de critères particuliers
Surnageant	Liquide qui, après centrifugation, se trouve au-dessus du sédiment (cf. sédiment).
Suspendre	Répartir des éléments solides dans une solution
Suspension	Liquide contenant des éléments solides, répartis de manière uniforme
TA	Température ambiante (env. 22°C)

Mode d'emploi des micropipettes:

Remarques générales:

- Ne réglez **jamais** une pipette à un volume pour lequel elle n'a pas été conçue! (Ne pas forcer son mécanisme en le tournant!)
- Ne plongez **jamais** une pipette dépourvue de pointe dans une solution!
- N'utilisez **jamais** la même pointe de pipette pour différentes solutions!

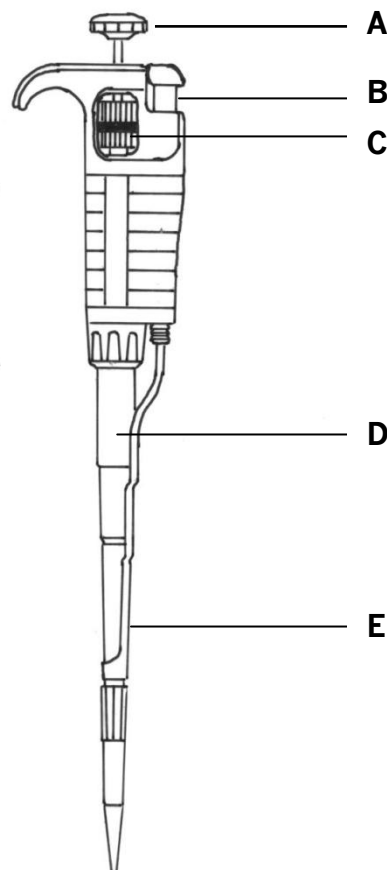
Pipettes pour quatre catégories de volumes de référence:

0.5-10 μ l (Pipettes marquées de blanc) → utiliser des pointes de pipettes blanches

2-20 μ l (Pipettes marquées de rouge) → utiliser des pointes de pipettes jaunes

20-200 μ l (Pipettes marquées de jaune) → utiliser des pointes de pipettes jaunes

100-1000 μ l (Pipettes marquées de bleu) → utiliser des pointes de pipettes bleues



A: Bouton

B: Bouton d'éjection

C: Bague de réglage

D: Tige

E: Ejecteur de tige

Réglage du volume:

Le volume à pipeter est réglé à l'aide de la bague de réglage noir, cannelée (C). Le volume réglé apparaît sur le voyant à trois chiffres que l'on lit de haut en bas.

La signification des chiffres rouges ou noirs est expliquée ci-après au moyen d'exemples:

Pipettes 0.5-10 μ l et 2-20 μ l:
chiffres rouges en bas = 1/10 μ l

0
7
5

7.5 μ l

rouge

1
2
5

12.5 μ l

Pipette 20-200 μ l:
que des chiffres noirs = μ l

0
7
5

75 μ l

1
2
5

125 μ l

Pipette 100-1000 μ l:
chiffres rouges en haut = ml

0
7
5

0.75 ml

rouge

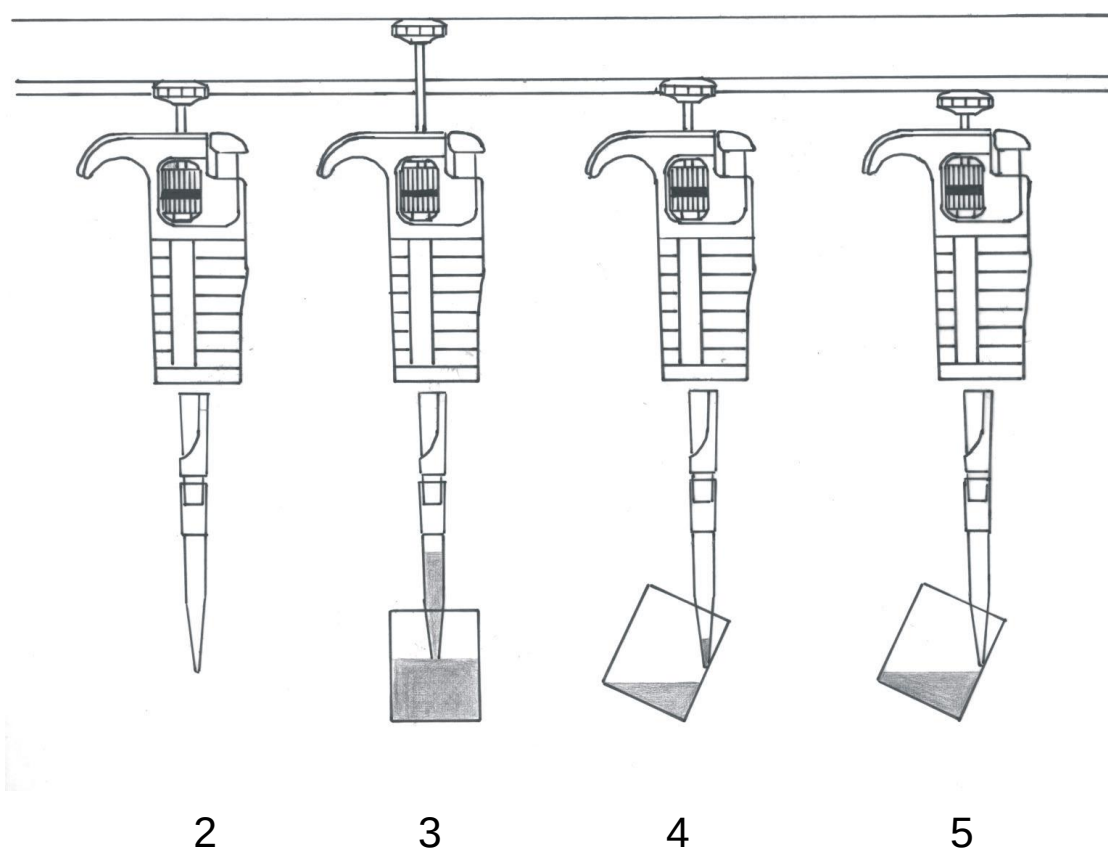
1
0
0

1 ml

Comment pipeter:



1. Placez la pointe de pipette correcte sur la tige de la pipette.
Attention: Ne jamais aspirer de liquide avec une micropipette sans pointe!
 2. Presser le bouton **(A)** jusqu'à la première butée, avant de plonger la pointe dans le liquide destiné à être aspiré.
 3. Plonger la pointe verticalement dans le liquide et relâcher lentement la pression sur le bouton (le liquide est aspiré). Attendre deux à trois secondes, puis retirer la pointe de la pipette du liquide.
 4. Placer la pointe de la pipette contre la paroi du second récipient en position oblique et presser lentement le bouton jusqu'à la première butée. Le liquide est ainsi expulsé.
 5. Ensuite, presser le bouton jusqu'à la seconde butée. L'air contenu ainsi comprimé expulse alors l'éventuel liquide résiduel hors de la pointe. Retirer la pipette du récipient tout en maintenant le bouton enfoncé et ne relâcher le bouton qu'une fois l'opération effectuée.
- L'élimination de la pointe utilisée a lieu en pressant le bouton d'éjection **(B)**



Mode d'emploi de la centrifugeuse



Cet appareil permet de centrifuger des éprouvettes Eppendorf de 1,5 ml et 2 ml.

1. Ouvrez le couvercle de la centrifugeuse en appuyant sur le bouton « open ».
2. Répartissez les éprouvettes de manière symétrique dans le rotor.



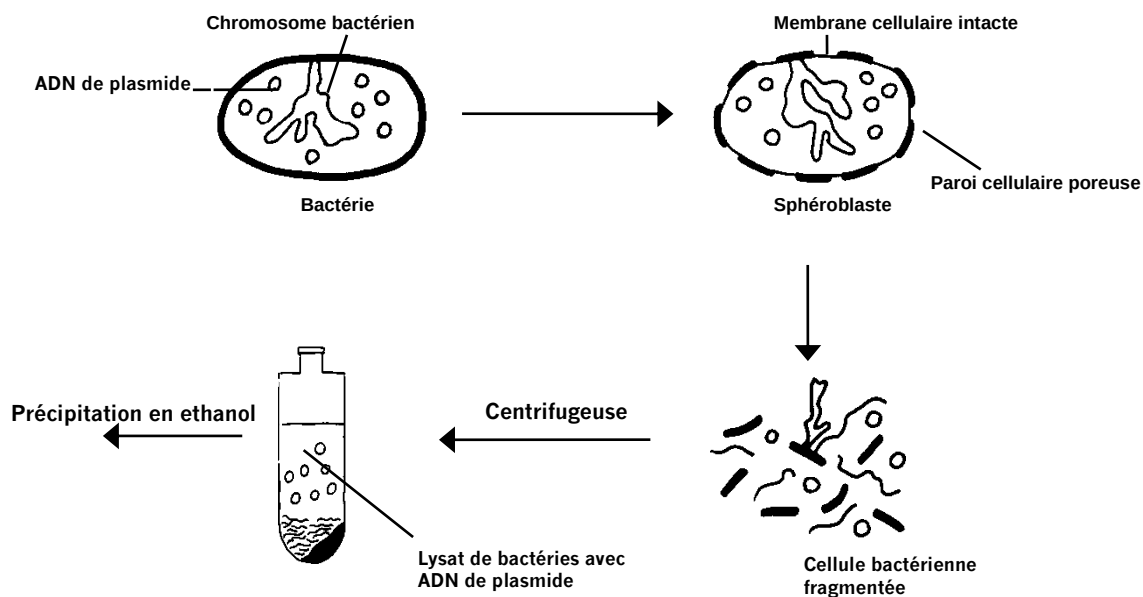
Attention: Il faut toujours placer des éprouvettes de poids environ équivalent les unes en face des autres dans le rotor, afin d'éviter tout déséquilibre lors de la centrifugation.

3. Mettez le couvercle du rotor et refermez le couvercle de la centrifugeuse.
4. Ajustez la durée de la centrifugation avec les boutons « ▼ » et « ▲ ». Maintenez la vitesse au maximum (13'400 rpm).
5. Actionnez la centrifugeuse en appuyant sur « start ».
6. Lorsque la centrifugation est terminée, le couvercle se déverrouille automatiquement.

Expérience 1: Purification de l'ADN

Méthode:

Lorsque des bactéries transformées avec de l'ADN de plasmide sont multipliées dans un milieu BL contenant un antibiotique (temps de doublement env. 30 minutes), l'ADN de plasmide qui y a été introduit se multiplie également. Dans l'expérience 1, la culture de bactéries mise à votre disposition a été imprégnée par l'un des trois plasmides suivants : pGEM1, PBluescript ou pUC18. Afin de pouvoir identifier « votre » plasmide à l'aide de l'analyse de restriction, il vous faudra, dans un premier temps, l'isoler de la culture de bactéries.



Matériel:

Micropipette 100-1000 µl
Micropipette 5-50 µl
Micropipette 1-10 µl
Pointes de pipettes bleues, jaunes, blanches
Epprouvettes Eppendorf 2ml
Epprouvettes Eppendorf 1.5 ml
Mélangeur Vortex
Centrifugeuse
Rack

Culture de bactéries liquide (4ml)
Tampon pour lyse
Solution de lysozyme
Solution de glycogène
Tampon TE
Ethanol 98%
Sachet pour déchets
Flacon pour déchet
Bain de glace

Marche à suivre:

1. Pipetez 2ml de la culture de bactéries liquide dans une éprouvette Eppendorf de 2ml et centrifugez-la pendant 2 minutes.
2. Éliminez soigneusement le surnageant, en le pipetant dans le flacon pour déchets.
3. Répétez les points 1 et 2 avec le reste de la culture de bactéries liquide (2 ml). Pipetez dans la même éprouvette de 2ml qui contient les bactéries sédimentées de la première centrifugation. (L'objectif consiste à obtenir toutes les bactéries de la culture liquide sous forme de sédiment dans l'éprouvette Eppendorf de 2ml.)
4. Mettez en suspension les bactéries sédimentées avec 250µl de tampon pour lyse sur le mélangeur vortex.
5. Incubez la suspension 5 minutes sur de la glace.
6. Ajoutez 25µl de solution au lysozyme à la suspension de bactéries.
7. Réchauffez l'échantillon 5 minutes à 95°C.
8. Centrifugez l'échantillon 10 minutes.
9. Pipetez le surnageant soigneusement dans un nouveau tube à 1.5ml.
10. Ajoutez au surnageant 1µl de solution au glycogène.
11. Ajoutez-y 500µl d'éthanol glacé (98%), mélangez bien l'échantillon et placez-le 10 minutes sur de la glace.
12. Centrifugez l'échantillon 10 minutes.
13. Éliminez entièrement le surnageant (pipetez le surnageant dans le flacon pour déchets!). Attention: Le sédiment d'ADN est très petit et donc difficilement visible!!
14. Laissez le tube avec le sédiment d'ADN ouvert env. 5-10 minutes à TA (l'éthanol s'évapore).
15. Le sédiment d'ADN est dissout dans 30µl de tampon TE par aspiration et expulsion de la pipette. Tâchez d'éviter la formation de mousse.

Evaluation:

Env. 16 µl sont utilisés pour une analyse de restriction, tel que décrit dans l'expérience 2.



Déchets:

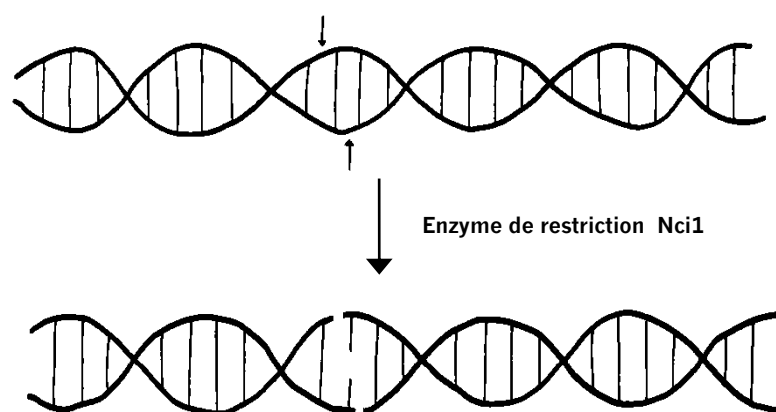
Les déchets solides issus de cette expérience doivent être collectés dans un sacnet prévu à cet effet et les déchets liquides doivent être collectés dans le flacon pour déchets.

Expérience 2: Caractérisation de l'ADN par analyse de restriction

Méthode:

Certaines enzymes sont capables de reconnaître certaines séquences spécifiques de nucléotides (suite de caractères) sur l'ADN et de découper l'ADN à ces endroits. Ces enzymes proviennent de bactéries et sont appelées enzymes de restriction. Leur disponibilité représente une condition de base à l'élaboration de l'ADN.

Dans cette expérience, le plasmide (pGEM1, pBluescript ou pUC18, séquences de nucléotides page 22) obtenu au cours de l'expérience 1 (est découpé par l'enzyme de restriction Nci1 (digestion). La séquence reconnue par cette enzyme de restriction est : $CC^{\downarrow}(G/C)GG$.



Matériel:

Epprouvette Eppendorf blanche de 1.5ml
Epprouvette Eppendorf rouge de 1.5ml
Eau double-distillée
Tampon de restriction
Enzyme de restriction Nci1 (-20°C)
ADN de plasmide issu de l'exp. 1
Bain de glace

Sachet pour déchets
Rack
Thermo-bloc 37°C
Centrifugeuse
Micropipette 1-10 µl
Micropipette 5-50 µl
Pointes de pipettes blanches et jaunes

Marche à suivre:

1. Inscrivez votre nom sur les couvercles de chaque éprouvette Eppendorf blanche et rouge.
2. Pipetez d'après le schéma suivant:



Pipetez l'enzyme de restriction dans l'éprouvette rouge en dernier lieu, après avoir brièvement centrifugé les deux éprouvettes..

Eprouvette rouge

10 µl ADN de plasmide de l'exp. 1
2.5 µl eau double-distillée
1.5µl tampon de restriction
1 µl enzyme de restriction Nci1

Eprouvette blanche

6µl ADN de plasmide de l'exp. 1
7.5µl eau double-distillée
1.5µL tampon de restriction

3. Fermez les éprouvettes, centrifugez 1 minute et incubez les échantillons pendant 45-90 minutes à 37°.



Quelle est l'action du tampon de restriction ?



Qu'est-ce qui sert de substrat (serrure) à l'enzyme (clé) dans cette analyse de restriction ?



Pourquoi n'ajoute-t-on l'enzyme de restriction qu'à la fin ?



Pourquoi utilise-t-on des échantillons sans enzyme de restriction?

Evaluation:

La digestion par enzyme de restriction est analysée dans l'expérience 3.



Déchets:

Les déchets issus de cette expérience doivent être collectés dans un sacnet prévu à cet effet.

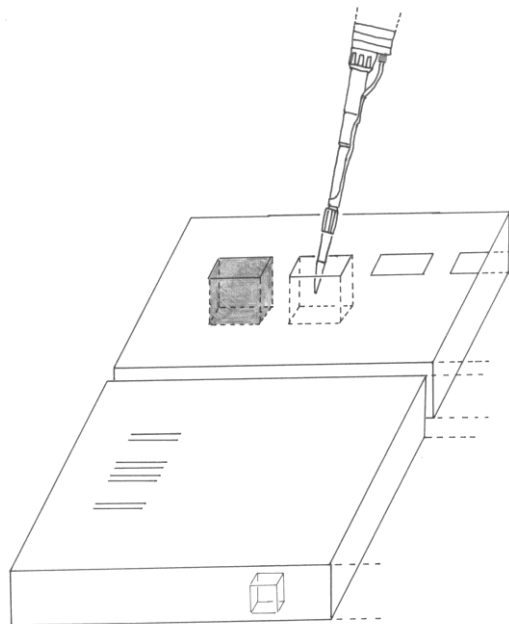
Expérience 3: Séparation et mise en évidence de fragments d'ADN par électrophorèse sur gel

Méthode:

Dans l'expérience 2 vous avez découpé de l'ADN de plasmide à l'aide d'une enzyme de restriction (digestion). Dans l'expérience suivante, les morceaux d'ADN ainsi obtenus (fragments) vont être séparés d'après leur taille. Cette séparation a lieu dans un champ électrique. L'ADN a une charge négative et migre donc vers le pôle positif du champ électrique. Lors de l'électrophorèse sur gel, les fragments d'ADN sont amenés à traverser un gel d'Agarose dans le champ électrique, que l'on peut comparer à une série de « grillages ». Plus les fragments d'ADN sont petits, plus ils migrent avec facilité à travers ce « grillage ». Au cours du même laps de temps, les petits fragments d'ADN traversent donc, une distance plus longue que les fragments d'ADN de plus grande taille. Les fragments de taille identique s'agglomèrent en bandes épaisses dans le gel.

Après cette séparation par électrophorèse, les fragments d'ADN doivent être rendus visibles dans le gel. Un colorant fluorescent a été ajouté au gel, qui rend les bandes d'ADN visibles sous la lumière UV directement après l'électrophorèse.

On obtient alors un motif de bande caractéristique. Si le nombre et la taille des fragments a été déterminée théoriquement à l'aide de la carte de plasmide (voir page 20), on peut comparer celle-ci avec le motif de bande apparaissant sur le gel et ainsi identifier le plasmide.



Matériel:

Epprouvette Eppendorf blanche de l'expérience 2
Epprouvette Eppendorf rouge de l'expérience 2
Tampon de charge
Marqueur de poids moléculaire pour ADN
Générateur
Cuve à électrophorèse avec gel d'Agarose
Sachets pour déchets

Lampe à UV
Rack
Micropipette 5-50 µl
Micropipette 1-10 µl
Pointes de pipettes jaunes et blanches

Marche à suivre:

1. Pipetez dans chacune des éprouvettes Eppendorf blanche et rouge, 2µl de tampon de charge.

Attention: le tampon de charge est très visqueux. Il est donc très difficile d'effectuer un pipetage exact. Pipetez donc lentement.



Pourquoi faut-il ajouter du tampon de charge dans les échantillons?

2. Centrifugez brièvement les échantillons.
3. Ecoutez l'explication du principe de fonctionnement de l'appareil à électrophorèse. La responsable du cours pipette 8µl du marqueur de poids moléculaire d'ADN dans la première poche (puits).
4. Pipetez lentement 15µl d'un échantillon dans l'un des puits (= poche) du gel. Il faut veiller à ce que la pointe de la pipette ne traverse pas le puits. Lors du pipetage, tenez la pipette à la verticale au-dessus de la poche.
5. Répétez ce processus avec tous les échantillons. Pour chaque échantillon, utilisez une poche vide.
6. L'électrophorèse dure env. 60 minutes à 140V/120mA.



Attention: Seul le responsable du cours utilise les appareils!

7. Quand l'électrophorèse est terminée, la responsable du cours, portant des gants, ôte soigneusement le support d'agarose de la cuve à électrophorèse. Le gel est évalué sous la lampe UV.

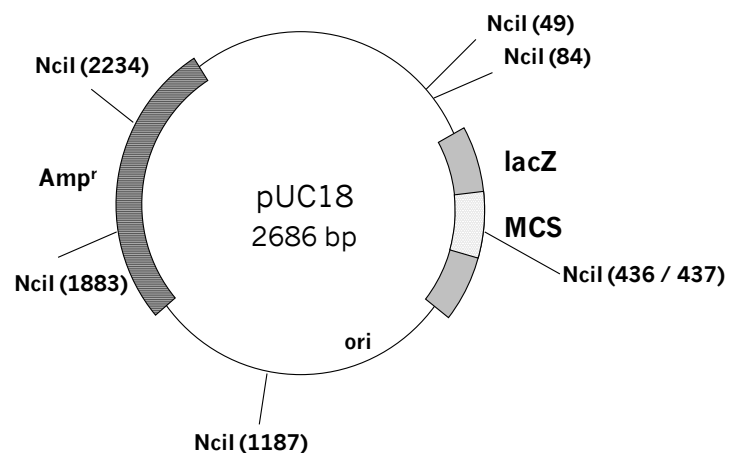
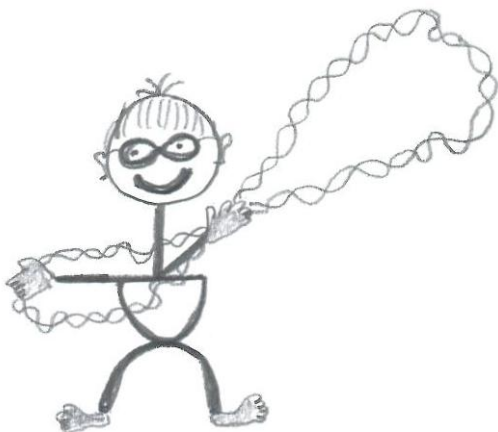
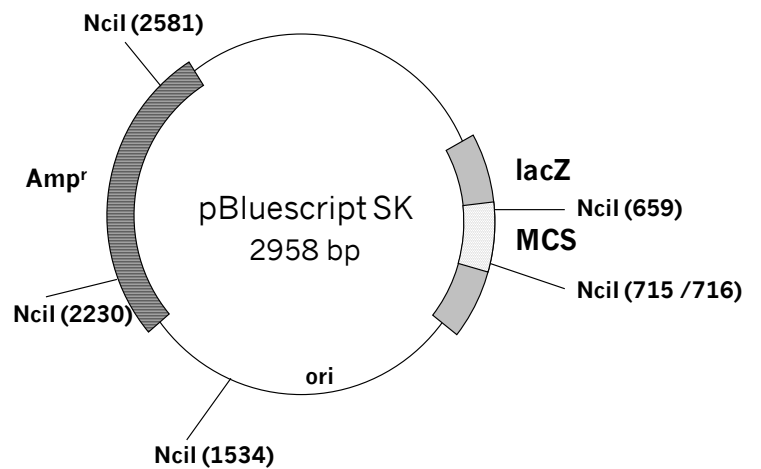
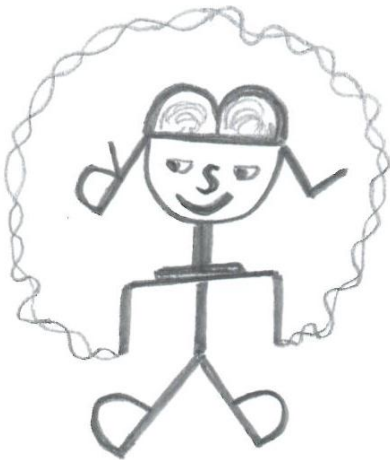
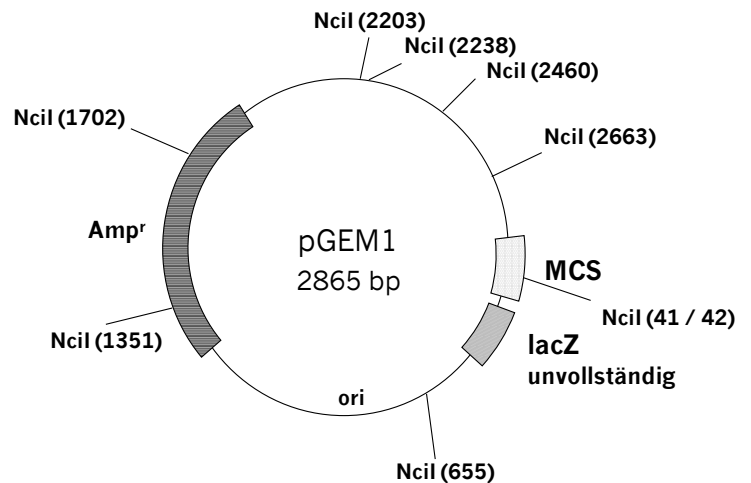


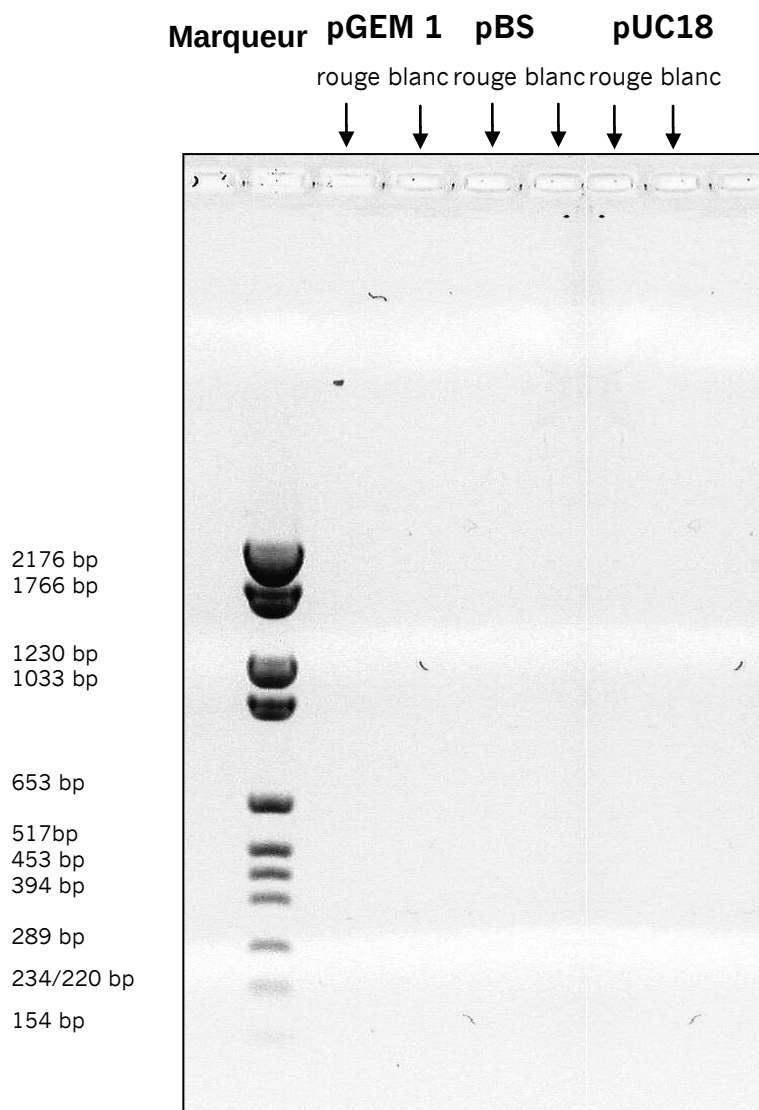
Attention: La lumière UV peut endommager les yeux! Fermez toujours l'écran protecteur avant d'enclencher l'appareil!

Evaluation:

Pour chacun des trois plasmides utilisés, pGEM1, pBluescript et pUC18, la séquence d'identification spécifique reconnue de Nci1 est présente plusieurs fois. Les positions de cette séquence de reconnaissance sont indiquées ci-dessous dans les trois cartes de plasmides. Elles permettent de calculer la taille des fragments d'ADN.

Séquence de reconnaissance de l'enzyme de restriction Nci1: $CC\downarrow(G/C)GG$
 $GG(C/G)\uparrow CC$





? Calculez le nombre et la taille des fragments attendus pour tous les trois plasmides en utilisant les cartes de plasmides de la page 20.

? Marquez ce résultat théorique sur la photo du gel (page 19). A l'aide du marqueur on peut estimer la position des bandes pour les fragments calculés.

Quel résultat obtiendra-t-on pour l'essai avec le plasmide non-fragmenté. Marquez également votre proposition sur la photo du gel.

? Comparez le nombre et la position des fragments visibles sur le gel avec le résultat théorique sur votre dessin. Lequel des trois plasmides a été isolé par votre groupe ?

? Pourquoi ne voit-on pas tous les fragments produits par la digestion de restriction sur le gel ? Dans quelle mesure l'analyse des fragments par électrophorèse sur gel est limitée.

Séquence de pGEM1 (5'→3')

```

1  gaatacaagc ttgggctgca ggtcgactct agaggatccc cgggcgagct cgaattccg
61  tctccctata gtgagtcgta ttaatttcga taagccagct gcattaatga atcggccaac
121 ggcgggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc
181 tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgg
241 tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacaatgt agcaaaaggc cagcaaaagg
301 ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg
361 agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa ccgacagga ctataaagat
421 accaggcggt tccccctgga agtccctcgc tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta
481 ccggatacct gtccgccttt ctccctcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct
541 gtaggtatct cagttcgggt taggtcgctt gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc
601 ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa
661 gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg
721 taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag
781 tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt
841 gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta
901 cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc
961 agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca
1021 cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa
1081 cttggtctga cagttacca tgcctaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat
1141 ttcgttcate catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct
1201 taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt
1261 tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat
1321 ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta
1381 atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg
1441 gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt
1501 tgtgcaaaaa agcggtttag tccctcgggc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg
1561 cagtgttatc actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg
1621 taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc
1681 ggcgaccgag ttgctcttgc cggcgctcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa
1741 ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac
1801 cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt
1861 ttactttcac cagcgtttct ggggtagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg
1921 gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa
1981 gcatttatca ggggtattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata
2041 aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca
2101 ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gagggccctt cgtctcgcgc
2161 gtttcgggtg tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt
2221 gtctgtaagc ggatgcccgg agcagacaag ccgctcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg
2281 ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata
2341 tcgacgctct cccttatgcg actcctgcat taggaagcag ccagtagta ggttgaggcc
2401 gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag atggcgccca acagtcccc
2461 ggccacgggg cctgccacca taccacgcgc gaaacaagcg ctcatgagcg cgaagtggcg
2521 agccccgatc tccccatcgg tgatgcggcg gatataggcg ccagcaaccg cacctgtggc
2581 gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc tggctagcga tgaccctgct
2641 gattggttcg ctgaccattt ccggggtgcg gaacggcggt accagaaact cagaagggtc
2701 gtccaaccaa accgactctg acggcagttt acgagagaga tgatagggtc tgcttcagta
2761 agccagatgc tacacaatta ggcttgatac tattgtcggt agaacgcggc tacaattaat
2821 acataacctt atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca ctata

```

? Combien de séquences de reconnaissance pouvez-vous trouver dans la première ligne ?

Sequence de pBluescript (5'→ 3')

1	cacctaaatt	gtaagcgтта	atatттттгтт	aaaattcgcg	ttaaattтттт	gttaaatacg
61	ctcattтттт	aaccaatag	ccgaaatcgг	caaaatccct	tataaatcaa	aagaatagac
121	cgagataggg	ttgagtгттг	ttccagттттг	gaacaagagt	ccactatttaa	agaacгtgga
181	ctccaacгtc	aaagggcgaa	aaaccгtcта	tcaggгcgat	ggcccactac	gtgaaccatc
241	accctaataca	agттттттгг	ggtcgagгtg	ccgtaaagca	ctaaatcgga	accctaaggg
301	gagccccгga	tttagagctt	gacggggaaa	gccггcgaac	gtggcgagaa	aggaagggaa
361	gaaagcgaaa	ggagcgggгг	ctaggггггг	ggcaagtгta	gcgгtcacгc	tgггcgtaac
421	caccacaccc	gccгггггта	atгггггггг	acagгггггг	tcccattггг	cattcaggгг
481	гггcaactгt	tgгgaagggг	gatггггггг	ggгггггггг	ctattacггг	agггггггga
541	aggggggatгt	ггггcaaggг	gattaaггттг	ggtaacггca	ggггттттccc	agгtcacгagг
601	ttgtaaaacг	acгггcagгг	aattгtaata	ггactcacta	tagggггgaat	tgгггtacггг
661	gccccccгtc	gagгггггagг	гtatггataa	ггттггatat	gaattггггг	agccccggggг
721	atccactagт	tctagagггг	ccгггacггг	ggгггagггг	cagггттттг	tccггттtagт
781	gagggгтаat	ttггagггттг	гггтаatcat	ggггcatagгг	гттггггггг	tgaaattгггт
841	atccггггac	aattггacac	aacatacgag	ccгgaagcat	aaagгgtaaa	гггггггггг
901	cctaagtagт	гagгtaactc	acattaaттг	гггггггггг	atгггггггг	tггcagгггг
961	gaaacгггг	ггггcagггг	cattaaггga	tггггcaacг	ггггггггga	ggгггггггг
1021	gtattггггг	гггггггггг	tггггггггг	гггactгггг	гггггггггг	гггггггггг
1081	ggггagгггг	atcagгггac	tcaaagгггг	taatacгггг	atccacagaa	tгггггггa
1141	acггcagгaaa	gaacatггga	gcaaaagггг	agcaaaagгг	caggaaccгг	aaaaagгггг
1201	гггггггггг	гттттггггг	aggггггггг	cccггггггг	гcatcacaaa	aatггггггг
1261	caagггcagag	ггггггgaac	ccггacagгг	tataaagata	ccagгггггг	ccccгггga
1321	гггггггггг	гггггггггг	гггггггггг	гггггггггг	гггггггггг	tггггггггг
1381	tccггггггг	aagггггггг	гггггггггг	гггггггггг	tagггггггг	agгггггггг
1441	agгггггггг	гггgaagггг	ggгггггггг	acgaacгггг	гггггггггг	gacггггггг
1501	гггггггггг	taactatггг	ггггagгггг	acггггггga	acacгггггг	tггггггггг
1561	cagггггггг	гггgaacagг	attagггггг	гггггггггг	agгггггггг	acagagгггг
1621	tgaagггггг	ггггaaactac	ggгггггггг	gaaggггггг	attггггггг	гггггггггг
1681	tgaagггггг	tacггггггг	aaaagagггг	ггagгггггг	atccгггггг	caaaccгггг
1741	гггггггггг	гггггггггг	ггггггgaag	agгггггггг	гггггггггг	aaagгггггг
1801	aagaagгггг	гггггггггг	tггггггггг	гггггггггг	гггgaacгga	aactcagггг
1861	aagггггггг	ggггггггga	ttaacaaaaa	ggгггггггг	гггггггггг	ttaaattaaa
1921	aatgaagггг	taaataaatc	taagгггггг	atgagггаaac	гггггггггг	agгггггггг
1981	гггггггггг	гггггггггг	atгггггггг	tггггггггг	tггггггггг	atagгггггг
2041	gactccccгг	гггггггггг	actacггггг	ggгггггггг	acгггггггг	cccagггггг
2101	caatgatacc	гггггггггг	гггггггггг	гггггггггг	atcagггггг	aaccagгггг
2161	ccггаagggг	гггггггггг	agгггггггг	caactттггг	гггггггггг	cagггггггг
2221	attггггггг	ggagгггггг	ггаagггггг	гггггггггг	tagттггггг	aacггггггг
2281	ccattггггг	agгггггггг	гггггггггг	гггггггггг	tatггггггг	гггггггггг
2341	гггггггггг	atcaagгггг	гггггггггг	ccccatгггг	гггггггггг	гггггггггг
2401	гггггггггг	tггггггггг	гггггггггг	agгггггггг	agгггггггг	гггггггггг
2461	гггггггггг	гггггггггг	гггггггггг	гггггггггг	aagatггггг	tггггггггг
2521	гггггггггг	aaccaagггг	гггггггггг	agгггггггг	гггггггггг	гггггггггг
2581	гггггггггг	acгггггггг	acгггггггг	atagгггггг	ттгггггггг	гггггггггг
2641	gaaaacгггг	гггггггггг	aaactггггг	ggгггггггг	гггггггггг	tггггггггг
2701	гггггггггг	гггггггггг	aactгггггг	гггггггггг	tactттгггг	agгггггггг
2761	ggгггггггг	aacagггаagг	caaaatгггг	caaaaaagгг	aataagгггг	acacгггггг

Sequence de pUC18 (5'→ 3')

tcgcgcgttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccg	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccg	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataaccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgccaa	gcttgcacgc	ctgcaggctg	420
actctagagg	atccccgggt	accgagctcg	aattcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	480
gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	540
aaagcctggg	gtgcctaata	agttagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	600
gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	acgcgcgggg	660
agaggcgggt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	tcactgactc	gctgcgctcg	720
gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	780
gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccagggaac	840
cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	900
aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagac	gactataaag	ataccaggcg	960
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	1020
ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgct	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtagggtat	1080
ctcagttcgg	tgtaggctcg	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	1140
cccgcacgct	gcgccttata	cggtaactat	cgtcttgagt	ccaacccggg	aagacacgac	1200
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggg	1260
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtattttgg	1320
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	1380
aaacaaacca	ccgctggtag	cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	1440
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	1500
gaaaactcac	gttaagggat	tttggctcat	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	1560
cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttgggtc	1620
gacagttacc	aatgcttaat	cagttaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atctcggtca	1680
tccatagtgt	cctgactccc	cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	1740
ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	1800
ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	1860
atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtgtg	1920
cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtggtgtcac	gctcgtcggt	tggtagggct	1980
tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	2040
aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgata	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	2100
tcactcatgg	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcattgccatc	cgtaagatgc	2160
ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	2220
agttgctctt	gcccggcgct	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	2280
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	2340
agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	2400
accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	2460
gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	2520
cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	2580
ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tctaagaaac	cattattatc	2640
atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	acgaggccct	ttcgtc		2686